



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Daniel DUPRET et al.

Serial Number: 09/840,861

Filed: April 25, 2001

Title: Process For In Vitro Creation
Of Recombinant Polynucleotide
Sequences By Oriented Ligation

Art Unit: 1637

Examiner: Y. KIM

Attorney Docket No.: 58763.000013

**SUBMISSION OF
CERTIFIED COPY
OF FOREIGN
PRIORITY
DOCUMENT**

Director of the United States Patent and Trademark Office
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:


Applicants submit the attached certified copy of FR 98/10338 patent application filed August 12, 1998. Applicants claim priority to this foreign patent application under 35 U.S.C. § 119 (b).

Respectfully submitted,

HUNTON & WILLIAMS

Dated: 12-24-03

By: _____


Robert M. Schulman
Registration No. 31, 196
Samson Vermont
Registration No. 42,202

Intellectual Property Department
1900 K Street, N.W., Suite 1200
Washington, D.C. 20006-1109
(202) 955-1926-Telephone
(202) 778-2201-Facsimile



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 SEP. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

12.08.1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 10338 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

12.08.98

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BREESE MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
P071B1246FR 0147036777

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☐ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☒ demande initiale
☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n° date

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE DE PRODUCTION IN VITRO DE SEQUENCES POLYNUCLEOTIDIQUES
RECOMBINEES, BANQUES DE SEQUENCES ET SEQUENCES AINSI OBTENUES

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

PROTEUS

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

Pays

1105 avenue Pierre MENDES FRANCE
30000 NIMES

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire)

MAJEROWICZ Marc
960703

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

P71B1246FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98/10338

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE DE PRODUCTION IN VITRO DE SEQUENCES POLYNUCLEOTIDIQUES RECOMBINEES,
BANQUES DE SEQUENCES ET SEQUENCES AINSI OBTENUES.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

BREESE-MAJEROWICZ

3, avenue de l'Opéra

75001 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DUPRET Daniel

8, chemin de Maruejols Sinsans

30420 CALVISSON

MASSON Jean-Michel

43, chemin Flou de Rious

31400 TOULOUSE

LEFEVRE Fabrice

2, rue Théodore Aubanel

Bâtiment B Appt. 208

30900 NIMES

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 19 Janvier 1999

BREESE Pierre
921038

PROCÉDÉ DE PRODUCTION *IN VITRO* DE SÉQUENCES
POLYNUCLÉOTIDIQUES RECOMBINÉES, BANQUES DE SÉQUENCES ET
SÉQUENCES AINSI OBTENUES.

5

La présente invention se rapporte à une
méthode de production *in vitro* de séquences
polynucléotidiques recombinaées. L'invention vise tout
particulièrement à générer puis sélectionner des
10 séquences polynucléotidiques susceptibles de présenter
des propriétés avantageuses par rapport à des séquences
témoins et donc capables de conférer un phénotype
nouveau et/ou de produire des protéines nouvelles.

15

Différentes techniques ont été développées
pour favoriser la recombinaison *in vitro* entre
différentes séquences polynucléotidiques, parmi celles-
ci on peut citer plus particulièrement le DNA-Shuffling
(11) et le StEP (13) toutes deux fondées sur
l'utilisation de la PCR.

20

Le DNA-Shuffling comporte deux étapes, la
fragmentation aléatoire par la DNase I de séquences
polynucléotidiques, et une amplification par PCR dans
laquelle les fragments précédemment générés servent
d'amorces. A chaque étape d'hybridation, le changement
25 de matrice provoque des recombinaisons au niveau des
régions ayant des séquences homologues. Une
représentation schématique de cette méthode est donnée à
la figure 1A en annexe.

25

30

Le StEP consiste à mélanger différentes
séquences polynucléotidiques contenant diverses
mutations en présence d'une paire d'amorces. Ce mélange
est soumis à une réaction de type PCR dans laquelle les
étapes d'hybridation et de polymérisation sont
regroupées en une seule étape de très courte durée. Ces
35 conditions permettent l'hybridation des amorces mais
diminuent la vitesse de polymérisation, de façon à ce
que les fragments qui sont partiellement synthétisés

35

s'hybrident aléatoirement sur les séquences polynucléotidiques portant les différentes mutations, permettant ainsi la recombinaison. Une représentation schématique de cette méthode est donnée à la figure 1B en annexe.

Dans chacune de ces deux méthodes, l'étape de polymérisation est indispensable au processus de recombinaison. Ainsi, en fonction des polymérases choisies, cette étape de polymérisation peut être génératrice de mutations supplémentaires non souhaitées. En outre, à partir d'un certain nombre de cycles, le DNA-Shuffling et le STEP repose sur le principe de l'hybridation d'une "méga-amorce" (6) sur une matrice, ce qui entraîne probablement des difficultés de mise en oeuvre pour des séquences polynucléotidiques dont la taille est supérieure à 1,5 Kpb (10). Enfin, ces deux techniques ne permettent pas de contrôler le taux de recombinaisons, puisque celles-ci se font aléatoirement au cours des étapes successives de polymérisation.

La présente invention vise précisément à palier les inconvénients ci-dessus en offrant une méthode simple de préparation de séquences polynucléotidiques recombinées, permettant de générer des séquences polynucléotidiques susceptibles de présenter des propriétés avantageuses par rapport à des séquences témoins et donc capables de conférer un phénotype nouveau et/ou de produire des protéines nouvelles.

Ce but est atteint grâce à un procédé de production *in vitro* de séquences polynucléotidiques recombinées à partir d'une banque de séquences polynucléotidiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la fragmentation d'une banque initiale de séquences polynucléotidiques double-brins,

b) la dénaturation des fragments issus de l'étape (a) éventuellement en présence d'une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage,

5 c) l'hybridation desdits fragments en présence d'une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage si celle(s)-ci n'est (ne sont) pas présente(nt) à l'étape (b),

d) la ligation desdits fragments,

10 e) le clonage des séquences polynucléotidiques recombinaées.

Le procédé de l'invention peut comprendre en outre, une ou plusieurs des étapes suivantes :

15 - la répétition des étapes (b), (c) et (d) à la fin de l'étape (d),

- la séparation des séquences polynucléotidiques recombinaées de la ou des matrice(s) d'assemblage avant l'étape (e),

20 - l'amplification des séquences polynucléotidiques recombinaées double brin avant l'étape (e) de clonage.

25 Les extrémités des fragments générés à l'étape (a) sont telles qu'il puisse y avoir hybridation adjacente de ces extrémités sur la ou les matrice(s) d'assemblage à l'étape (c) et ligation de ces fragments les uns avec les autres à l'étape (d). Les séquences polynucléotidiques de la banque initiale doivent présenter des zones d'homologie soit entre elles, soit
30 avec les matrices d'assemblage, permettant de générer des extrémités de fragments telles que décrites ci-dessus.

35 Une forme de mise en oeuvre avantageuse du procédé de l'invention consiste à réaliser simultanément les étapes (c) et (d) selon une réaction dite de RLR

pour l'expression anglaise de "Recombining Ligation Reaction".

5 Outre les avantages indiqués précédemment, le procédé de l'invention est remarquable en ce qu'il favorise et accélère la recombinaison aléatoire *in vitro* de séquences polynucléotidiques, ces séquences polynucléotidiques pouvant être des gènes.

10 La recombinaison *in vitro* des séquences polynucléotidiques de la banque initiale par le procédé de l'invention permet donc d'obtenir une nouvelle banque contenant des séquences ayant cumulé les caractéristiques des séquences de la banque précédente. Le procédé de l'invention constitue donc une technique
15 d'évolution *in vitro*.

 Le procédé de l'invention constitue une alternative à la PCR recombinatoire telle que mise en oeuvre dans les techniques de DNA shuffling (11) ou de
20 StEP (13), puisqu'il ne nécessite pas d'étape de polymérisation *in vitro* pour aboutir à la recombinaison. Au contraire, l'étape clef du procédé de l'invention est l'étape (d) de ligation à haute température sur une matrice d'assemblage, ce qui assure un très haut degré
25 de fidélité au cours des événements de recombinaison.

 La fragmentation de ces séquences polynucléotidiques à l'étape (a) permet de contrôler avec précision le degré de recombinaison voulu et la
30 position des points de recombinaison. Ainsi, plus le nombre de fragments générés par séquence est grand, plus le nombre de fragments nécessaires pour recomposer une séquence est élevé, ce qui entraîne un taux de recombinaison élevé. En outre, la nature et la position
35 des extrémités des fragments générés dans ce mode de réalisation du procédé de l'invention sont connues et contrôlées, ce qui permet :

- de contrôler avec précision les zones où la recombinaison a lieu, ou
- d'induire la recombinaison entre des séquences polynucléotidiques, par exemple des gènes, si les extrémités des fragments sont créées dans des zones d'homologie entre ces séquences, ou des zones d'homologies entre ces séquences et la ou les matrices d'assemblage.

10 Le procédé de l'invention peut être appliqué à l'orientation de la ligation multi-moléculaire à bouts francs. Dans cette application, on utilise comme matrice d'assemblage aux étapes a, b ou c des oligonucléotides juste complémentaires de l'extrémité 3' d'un fragment et 5' du fragment adjacent, ce qui permet 15 l'hybridation adjacente de ces deux extrémités sur la même matrice après l'étape de dénaturation. Une fois hybridées, les extrémités des fragments peuvent être liguées entre-elles de façon à orienter le sens de 20 ligation des fragments à bout francs.

La banque initiale de l'étape (a) peut être générée par toute méthode connue de l'homme du métier, par exemple à partir d'un gène sauvage par étapes de 25 mutagénèse dirigée successive, par PCR "error prone " (2), par mutagénèse aléatoire chimique, par mutagénèse aléatoire *in vivo*, ou en combinant des gènes de familles proches ou distinctes au sein de la même espèce ou d'espèces différentes de façon à disposer d'une variété 30 de séquences polynucléotidiques dans la banque initiale.

Parmi ces techniques, l'invention envisage plus particulièrement, un procédé dans lequel la banque initiale de séquences polynucléotidiques double-brins est obtenue par une réaction de polymérisation en chaîne 35 réalisée dans des conditions qui permettent de créer des mutations aléatoires.

Selon une forme de réalisation préférée du procédé de l'invention, l'étape (a) consiste à soumettre la banque initiale à une hydrolyse par l'action d'une ou plusieurs enzymes de restriction.

5 Pour accroître le degré de recombinaison généré par le procédé de l'invention, il suffit d'augmenter le nombre de fragments de restriction en utilisant des enzymes de restriction ayant un grand nombre de sites de coupure sur les séquences
10 polynucléotidiques de la banque initiale, ou en combinant plusieurs enzymes de restriction. Dans le cas de l'utilisation d'une ligase thermostable, la limite est fixée par la taille du plus petit fragment ainsi généré, par exemple supérieure ou égale à 40 pb, afin de
15 conserver une température d'hybridation compatible avec celle de l'étape (d) de ligation qui est généralement de l'ordre de 65 °C.

20 L'étape (a) peut encore être réalisée en générant une banque de fragments par traitement aléatoire avec la DNase I d'une banque initiale de séquences polynucléotidiques double brins partiellement hétérologues. Cette forme de mise en oeuvre du procédé de l'invention aurait la particularité de permettre
25 l'utilisation des fragments DNase I comme matrices les uns pour les autres, pour l'hybridation au cours de l'étape (c) ou de la réaction de RLR des étapes (c) et (d) simultanées.

30 Une mise en oeuvre similaire du procédé de l'invention peut être réalisée en combinant à l'étape (b) au moins deux banques de fragments distinctes générées séparément à l'étape (a) à partir de la même banque initiale par un traitement avec des enzymes différentes. La mise en oeuvre de telles banques ne
35 nécessite pas non plus l'utilisation de matrice consensus au cours des étapes (b) ou (c), puisque les fragments peuvent s'hybrider les uns sur les autres.

Les fragments de l'étape (a) du procédé de l'invention peuvent également être générés par des réactions PCR menées sur les séquences polynucléotidiques de la banque initiale. Deux solutions sont envisageables. Dans un premier cas, les oligonucléotides peuvent être conçus de manière à générer des fragments dont les extrémités sont adjacentes tout au long de la séquence d'assemblage. Dans un deuxième cas, les oligonucléotides sont conçus de façon à générer des fragments ayant des séquences communes, ces fragments pouvant servir de matrice d'assemblage les uns pour les autres à l'étape (b) ou à l'étape (c).

La matrice d'assemblage à l'étape (b) ou (c) est par exemple une séquence polynucléotidique issue de la banque initiale ou une séquence consensus de ladite banque, simple ou double brin. Dans le cas où la matrice d'assemblage est incorporée directement à l'étape (c) de l'invention, cette matrice doit être sous forme simple brin.

Selon une variante du procédé de l'invention, les matrices d'assemblage des étapes (b) ou (c) sont constituées d'oligonucléotides.

Selon une forme particulière de mise en oeuvre du procédé de l'invention, des oligonucléotides, simple ou double brin, de longueur variable, sont ajoutés à l'étape (c) en plus de la matrice. Ces oligonucléotides sont conçus pour pouvoir se substituer à une partie des fragments à l'étape (c), en effet, leur séquence est telle que :

- s'ils sont parfaitement homologues avec la séquence du fragment qu'ils remplacent, ils favorisent certaines combinaisons, ou

- s'ils sont partiellement hétérologues avec la séquence du fragment qu'ils remplacent, ils

introduisent une ou des mutations dirigées supplémentaires.

5 Avant l'étape (e) du procédé de l'invention,
il est possible de séparer les séquences
polynucléotidiques recombinées de la matrice
d'assemblage grâce à un marqueur présent sur la matrice
d'assemblage ou sur les séquences polynucléotidiques
10 recombinées. Il est en effet possible de marquer chaque
brin de la matrice selon des techniques connues de
l'homme du métier. Par exemple, le marqueur de la
matrice d'assemblage peut être un haptène et l'on sépare
les séquences polynucléotidiques recombinées de la
matrice d'assemblage par des techniques connues de
15 l'homme du métier, comme par exemple un anticorps anti-
haptène fixé sur un support ou une réaction biotine-
streptavidine, si l'haptène est un marqueur biotine.

D'autres techniques peuvent être employées
pour séparer les séquences polynucléotidiques
20 recombinées de la matrice d'assemblage. La matrice
d'assemblage peut aussi être préparée spécifiquement de
façon à faciliter son élimination à la fin du procédé de
l'invention. Elle peut ainsi être synthétisée par
amplification PCR utilisant des dATP méthylés, ce qui
25 permet sa dégradation par l'endonucléase de restriction
Dpn I. Dans ce cas, les séquences polynucléotidiques
recombinées ne doivent pas contenir de dATP méthylés. La
matrice peut aussi avoir été préparée par amplification
PCR en utilisant des dUTP, ce qui permet sa dégradation
30 par traitement avec une uracyl-DNA-glycosylase. A
l'inverse, il est possible de protéger les séquences
polynucléotidiques recombinées en les amplifiant par PCR
sélective avec des oligonucléotides portant des
groupements phosphorothioates en 5'. Un traitement avec
35 une exonucléase permet alors de dégrader spécifiquement
la matrice d'assemblage.

Comme indiqué précédemment, le procédé de l'invention peut comprendre avant l'étape (e) de clonage, une étape d'amplification des séquences polynucléotidiques recombinées. Toute technique d'amplification est acceptable notamment une amplification par PCR. Une des plus simple consiste à réaliser une PCR qui permet d'amplifier spécifiquement les séquences polynucléotidiques recombinées grâce à des amorces qui ne peuvent s'hybrider que sur les extrémités des séquences recombinées. Les produits PCR sont ensuite clonés pour être caractérisés.

L'invention concerne également un procédé pour générer des séquences polynucléotidiques de susceptibles des propriétés avantageuses par rapport à des séquences témoins. Ce procédé consiste à produire des séquences polynucléotides recombinées selon le procédé décrit précédemment, puis à cribler par tout moyen approprié les clones obtenus pour sélectionner ceux comprenant les séquences polynucléotidiques recombinées présentant des propriétés avantageuses par rapport à des séquences témoins. On entend, par exemple, par propriétés avantageuses la thermostabilité d'une enzyme ou sa qualité à pouvoir fonctionner dans des conditions de pH ou de température ou de concentration saline plus adaptées à un procédé enzymatique, que les protéines témoins habituellement utilisées pour ledit procédé. A titre d'exemple d'un tel procédé, on peut citer un procédé industriel de désencollage des fibres textiles ou de blanchiment des pâtes à papier ou de la production d'arômes dans l'industrie laitière

Selon un mode de réalisation avantageux de cette application du procédé de l'invention, la banque initiale peut donc être le résultat d'un crible ayant permis de sélectionner par tout moyen approprié les séquences polynucléotidiques présentant des propriétés avantageuses par rapport à des séquences témoins. Les

séquences ainsi sélectionnées constituent une banque initiale restreinte.

5 Mais, il est aussi possible de partir d'une banque initiale non restreinte afin de conserver la représentativité des propriétés contenues dans cette banque.

10 Les séquences codant pour les protéines présentant des propriétés avantageuses par rapport aux protéines témoin sont alors sélectionnées, par des criblages *in vivo* ou *in vitro*, et peuvent servir à constituer une nouvelle banque pour une éventuelle réitération du procédé de l'invention.

15 Parmi les techniques de criblage qui peuvent être appliquées à chacun des clones de l'étape (e), les techniques de criblage *in vitro* présentent l'avantage de s'affranchir des problèmes de physiologie cellulaire, et de tous les inconvénients liés au clonage d'expression *in vivo*. En outre, ce type de criblage est facilement automatisable, ce qui permet de cribler un nombre élevé
20 de séquences polynucléotidiques recombinées.

25 L'invention concerne aussi une séquence polynucléotidique recombinée obtenue par un procédé selon l'invention, ainsi qu'un vecteur contenant une telle séquence polynucléotidique recombinée, un hôte cellulaire transformé par une séquence polynucléotidique recombinée ou un vecteur de l'invention, ainsi qu'une protéine codée par cette séquence polynucléotidique recombinée. L'invention comprend également les banques
30 correspondantes de séquences polynucléotidiques recombinées, de vecteurs, d'hôtes cellulaires ou de protéines.

35 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples de réalisation de l'invention qui suivent et qui se réfèrent aux dessins en annexe dans lesquels :

La figure 1 est une représentation schématique des procédés de l'art antérieur correspondant respectivement au DNA-shuffling (figure 1A) et au STEP figure 1B).

La figure 2 est une représentation schématique d'un exemple de réalisation du procédé de l'invention et de certaines de ses variantes et application.

La figure 3 représente les positions des dix zones de mutations (*Pvu* II et *Pst* I) portées par chaque mutant du gène *ponB* utilisé pour les exemples de mises en oeuvre de l'invention.

La figure 4 représente la position des amorces utilisées par rapport à la séquence du gène *ponB*.

La figure 5 représente la migration des produits des réactions de RLR et de PCR des produits de ces réactions de RLR sur gel d'agarose.

La figure 6 représente la position des mutations par rapport aux fragments de restriction.

I - PRINCIPE.

Le procédé de l'invention a été mis en oeuvre à partir d'une banque de mutants du gène *ponB*, codant pour la PBPlb d'*E. coli* (1). Dix mutants de ce gène ont été utilisés. La séquence du gène de chaque mutant diffère de celle du gène sauvage par une zone non homologue de treize à seize bases de long constituée par la substitution de cinq codons initiaux par cinq codons alanines selon la technique décrite par Lefèvre et al. (8).

La substitution portée par chaque mutant est caractérisée par la présence d'un site unique de l'enzyme de restriction *Pvu* II encadré par deux sites de l'enzyme *Pst* I, qui permettent de distinguer les mutants les uns des autres par leur profil de digestion avec ces

endonucléases de restriction. La figure 3 représente les positions des dix zones de mutations (*Pvu* II et *Pst* I) portées par chaque mutant.

5 Après amplification par PCR des gènes des dix mutants, les produits PCR ont été purifiés, mélangés en quantité équimolaire pour constituer la banque initiale. Les séquences polynucléotidiques de cette banque ont été digérées par les enzymes de restriction
10 *Hinf* I et *Bsa* I, de façon à générer des banques de fragments de restriction. Les fragments de restriction ont alors été incubés avec la matrice sauvage, à différentes quantités, en présence d'une ligase thermostable. Après plusieurs cycles de
15 dénaturation/hybridation/ligation, une fraction de ce mélange réactionnel a été utilisée pour réaliser une amplification PCR avec un couple d'amorces spécifiques des extrémités 5' et 3' des gènes des mutants et non spécifiques des extrémités 5' et 3' de la matrice
20 sauvage. Le produit d'amplification a été cloné, et les clones obtenus ont été analysés pour leur profil de digestion avec l'endonucléase de restriction *Pvu* II ou *Pst* I. Les profils obtenus ont permis de déterminer quel(s) fragment(s) des mutants avai(en)t pu se
25 recombinaison avec les autres pour reconstituer un gène entier.

II - MATERIEL.

30 1) Souches et plasmides.

La souche MC1061 (F^- *araD*139, Δ (*ara-leu*)7696, *galE*15, *galK*16, Δ (*lac*)X74, *rpsL* (*Str*^R), *mcrA* *mcrB*1, *hsdR*2 ($r_k^- m_k^+$)) est dérivée d'*Escherichia coli* K12.

35 Le vecteur PARAPONB est issu du vecteur PARA13 (3) dans lequel le gène *ponB* portant un site de coupure thrombine (9) a été introduit entre les sites de

restriction *Nco* I et *Nar* I. Le vecteur pET26b+ fait partie de la famille des vecteurs pET développée par Studier et Moffatt (12) et commercialisés par la société NOVAGEN.

2) Oligonucléotides.

Les oligonucléotides ont été synthétisés par la société ISOPRIM (Toulouse). Les séquences des oligonucléotides sont rapportées dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I

Oligo N	5' ACTGACTACCATGGCCGGAATGACCGCGAGCC 3'
Oligo E	5' CCGCGGTGGAGCGAATTCTAATTACTACCAAACATATCC 3'
Oligo M1	5' GCGCCTGAATATTGCGGAGAAAAAGC 3'
Oligo M2	5' ACAACCAGATGAAAAGAAAGGGTTAATATC 3'
Oligo A1	5' ACTGACTACCATGGCC 3'
Oligo A2	5' CCGCGGTGGAGCGAATTC 3'

3) Réactifs.

Les enzymes de restriction et de modifications citées dans le tableau II ci-dessous ont été utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

Tableau II

Enzyme	Concentration	Fournisseur
<i>Nco</i> I	10 U/ μ l	NEB
<i>Pst</i> I	20 U/ μ l	NEB
<i>Eco</i> RI	20 U/ μ l	NEB
<i>Bsa</i> I	5 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Hinf</i> I	10 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Pvu</i> II	10 U/ μ l	New England Biolabs
T4 DNA ligase	400 U/ μ l	New England Biolabs
Taq ADN polymérase	5 U/ μ l	PROMEGA
AMPLIGASE	100 U/ μ l	EPICENTRE

Les tampons utilisés sont rapportés dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III

Tampons	Composition
T	Tris HCl 10 mM, pH 8.0
Polymérisation 20X	Tris HCl 100 mM pH 8,3, MgCl ₂ 15 mM, KCl 500 mM, 1.0% Triton X100®
Restriction A 10X	500 mM NaCl, 100 mM Tris HCl pH 7,9, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT
Restriction B 10X	1 M NaCl, 500 mM Tris HCl pH 7,9, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT
Restriction C 10X	500 mM NaCl, 1 M Tris HCl pH 7,5, 100 mM MgCl ₂ , 0,25% Triton X100®
AMPLIGASE 10X	200 mM Tris HCl pH 8,3, 250 mM KCl, 100 mM MgCl ₂ , 5 mM NAD, 0,1% Triton X100®
Ligation 10X	500 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 10 mM ATP, 250 µg/ml BSA

5

III - PREPARATION DE LA MATRICE.

Le gène *ponB* sauvage a été amplifié par une étape de réaction de PCR en utilisant comme amorces les oligonucléotides M1 et M2 (fig. 4). Cinq réactions de PCR ont été préparées en ajoutant 50 ng du plasmide pPONBPBR portant le gène sauvage (7) à un mélange contenant 10 µl de tampon de polymérisation, 10 µl de dNTPs 2mM, 20 pmol de chaque oligonucléotide M1 et M2, et 5U de Taq ADN polymérase, dans un volume final de 100 µl. Ces mélanges ont été incubés dans un thermocycleur Perkin-Elmer 9600 selon le programme suivant : (94°C - 2 min.) - (94°C 15 sec. - 60°C 30 sec. - 72°C 1 min.) x 29 cycles - (72°C - 3 min.).

20

Le produit des cinq PCR ont été mélangés et déposés sur un gel d'agarose TBE 1%. Après migration et coloration au bromure d'éthidium du gel, la bande à 2651 pb, correspondant au produit d'amplification du

gène *ponB* encadré par deux fragments de 26 pb et 90 pb respectivement, a été visualisée par trans-illumination aux ultraviolets, et découpée à l'aide d'un scalpel pour être purifiée avec le système Quiaquick (QIAGEN). La totalité de l'ADN ainsi purifié a été éluée dans 120 µl de tampon T. La concentration de cet ADN a été évaluée par un dosage spectrophotométrique à 260 nm, à 100 ng/µl.

IV - PREPARATION DE LA BANQUE.

1) Amplification des gènes mutants.

Les gènes des dix mutants ont été amplifiés séparément par l'intermédiaire d'une réaction de PCR en utilisant les oligonucléotides N et E. Ces oligonucléotides introduisent respectivement les sites de restriction *Nco* I et *Eco* RI, permettant de cloner les produits obtenus avec ces deux sites.

Chaque réaction de PCR a été préparée en ajoutant 50 ng du plasmide portant le gène mutant à un mélange contenant 10 µl de tampon de polymérisation, 10 µl de dNTPs 2mM, 20 pmol de chaque oligonucléotide N et E, et 5U de Taq ADN polymérase, dans un volume final de 100 µl. Ce mélange a été incubé dans un thermocycleur Perkin-Elmer 9600 selon le programme suivant : (94°C - 2 min.) - (94°C 15 sec. - 60°C 30 sec. - 72°C 1 min.) x 29 cycles - (72°C - 3 min.).

La spécificité de l'amplification génique a été vérifiée par profil de restriction avec l'endonucléase *Pvu* II, en incubant 5 µl de chaque produit PCR 1 heure à 37°C dans un mélange contenant 3 µl de tampon de restriction A et 5U de l'enzyme *Pvu* II dans un volume final de 30 µl. 15 µl de cette réaction de digestion ont été déposés sur un gel d'agarose TBE 1%. Après migration et coloration au bromure d'éthidium, le gel a été exposé aux ultraviolets. La visualisation des fragments de restriction a permis de confirmer la

spécificité de l'amplification génique de chaque gène mutant.

En parallèle, 3 µl de chaque réaction PCR ont été déposés sur un gel d'agarose TBE 1%. Après migration, le gel a été traité comme ci-dessus. L'intensité de chaque bande a permis d'estimer que les amplifications géniques avaient eu le même rendement.

2) Création des banques de fragments de restriction.

50 µl de chacune des dix PCR ont été mélangés et déposés sur un gel d'agarose TBE 1%. Après migration et coloration au bromure d'éthidium, la bande à 2572 pb, correspondant au produit d'amplification des gènes des dix mutants, a été découpée à l'aide d'un scalpel et purifiée avec le système Quiaquick (QIAGEN). La totalité de l'ADN ainsi purifié a été éluée dans 120 µl de tampon T. La concentration de cet ADN a été évaluée par un dosage spectrophotométrique à 260 nm, à 100 ng/µl.

Pour générer les banques de fragments de restriction, 100 µl de cet ADN ont été incubés une heure à 50°C dans un mélange contenant 12 µl de tampon de restriction B, 1,2 µl de BSA (à 10 mg/ml), 25 U de l'enzyme Bsa I et 4 µl d'eau. Puis 2 µl du tampon de restriction B, 2 µl de BSA (à 1mg/ml), 50 U de l'enzyme Hinf I et 11,5 µl d'eau ont été rajoutés au mélange, qui a été incubé une heure à 37°C. La totalité du mélange de digestion a été purifié sur une colonne QIAquick (QIAGEN), et élué avec 30 µl de tampon T. 1 µl de cet éluat a été déposé sur gel d'agarose TBE 1% pour vérifier que la digestion avait été totale, et qu'elle avait généré 6 fragments de restriction, et par conséquent six banques de fragments, de 590 pb, 500 pb, 472 pb, 438 pb, 298 pb et 274 pb. La concentration de cet ADN a été évaluée (par un dosage spectrophotométrique à 260 nm) à 250 ng/µl.

V - RLR (Recombining Ligation Reaction).

La réaction de RLR (Recombining Ligation Reaction) a été réalisée en incubant des quantités déterminées de fragments de restriction *Hinf* I - *Bsa* I des gènes des dix mutants avec la matrice complète (ie le gène *ponB* sauvage), en présence d'une ADN ligase thermostable. Le tableau IV ci-dessous rapporte la composition des mélanges de RLR.

Tableau IV

	RLR 1	RLR 2	RLR3	RLR4	T-
Fragments <i>Hinf</i> I - <i>Bsa</i> I des dix mutants (100 ng/ μ l)	0,5 μ l	1 μ l	2 μ l	5 μ l	5 μ l
Matrice <i>ponB</i> sauvage (100 ng/ μ l)	0,6 μ l	1,2 μ l	2,4 μ l	6 μ l	6 μ l
Tampon AMPLIGASE 10X	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
AMPLIGASE (25 U/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	-
H ₂ O	qsp 20 μ l	qsp 20 μ l	qsp 20 μ l	qsp 20 μ l	qsp 20 μ l

Le témoin négatif est identique à la réaction de RLR4, mais ne contient pas d'ADN ligase thermostable. Ces différents mélanges ont été recouverts d'une goutte d'huile minérale et incubés dans un thermocycleur Perkin-Elmer 9600 dans des microtubes de 200 μ l selon le programme suivant : (94°C 5 min.) - (94°C 1 min. - 65°C 4 min.) x 35 cycles.

10 μ l de chaque réaction de RLR ont alors été ajoutés à un mélange de réaction PCR contenant 10 μ l de tampon de polymérisation, 10 μ l de dNTPs 2 mM, 40 pmol de chaque oligonucléotide A1 et A2, et 5 U de Taq ADN polymérase dans un volume final de 100 μ l. Ce mélange a été incubé dans un thermocycleur Perkin-Elmer 9600 selon le programme suivant : (94°C 5 min.) - (94°C

30 sec. - 46°C 30 sec. - 72°C 1 min.) x 29 cycles - (72°C 2 min.). Cette réaction de PCR a permis d'amplifier spécifiquement les produits de ligation formés au cours de la réaction de RLR, sans amplifier la matrice, puisque les oligonucléotides A1 et A2 ne peuvent pas s'hybrider sur celle-ci, comme montré sur la figure 4.

5 µl de chaque réaction de RLR et 10 µl de chacune des réactions de PCR précédentes ont été déposés sur un gel d'agarose TBE 1%. Après coloration au bromure d'éthidium, le gel a été exposé aux ultraviolets, comme montré à la figure 5.

L'analyse de ce gel révèle que seule la réaction de RLR4 contient, comme le témoin négatif, des fragments de restrictions encore visibles (pistes 4 et 5).

L'absence de produit PCR pour le témoin négatif (piste 10) révèle non seulement que la réaction PCR est spécifique (pas d'amplification de la matrice complète), mais aussi que les fragments de restriction présents dans le mélange ne peuvent pas se substituer aux amorces pour générer un produit PCR contaminant dans les conditions choisies. En parallèle, la présence d'une bande unique à environ 2500 pb sur les pistes 6, 7 et 8 démontre qu'un produit de RLR a pu être amplifié par PCR pour les réactions de RLR1, 2 et 3. Ces trois réactions de RLR ont donc permis de reconstituer un ou des gènes complets à partir de six banques de fragments de restrictions.

VI - ANALYSE DES PRODUITS D'AMPLIFICATION DES REACTIONS DE RLR.

1) Clonage.

Les produits d'amplification PCR des réactions de RLR 1, 2 et 3 ont été purifiés avec le système Wizard PCR Preps (PROMEGA) et élués dans 45 µl

de tampon T. 6 μ l de chaque PCR purifiée ont été incubés 1 heure à 37°C dans un mélange contenant 3 μ l de tampon de restriction C, 3 μ l de BSA (à 1mg/ml), 20 U de l'enzyme *Eco* RI, 10 U de l'enzyme *Nco* I et 15 μ l d'eau.

5 En parallèle, deux vecteurs (pARAPONB et pET26b+) ont été préparés pour le clonage. Ces vecteurs ont été linéarisés en incubant 3 μ g de ces plasmides 2 heures à 37°C, dans un mélange contenant 3 μ l de tampon de restriction C, 3 μ l de BSA (à 1mg/ml), 20 U de l'enzyme *Eco* RI, 10 U de l'enzyme *Nco* I et 19 μ l d'eau.

10 Les vecteurs linéarisés ainsi que les PCR digérées ont été purifiés sur gel d'agarose TBE 1% avec le système QIAquick (QUIAGEN). Chaque vecteur ou chaque PCR digérée a été éluée dans 30 μ l de tampon T.

15 La ligation de chaque PCR digérée avec l'un ou l'autre des vecteurs a été réalisée selon les conditions décrites dans le tableau V ci-dessous, et incubée à 16°C pendant 16 heures.

20

Tableau V

	Ligation avec le vecteur pARAPONB				Ligation avec le vecteur pET26b+			
	LpAR1	LpAR2	LpAR3	TLpAR	LpET1	LpET2	LpET3	TLpET
PCR amplification RLR 1 digérée <i>Nco</i> I - <i>Eco</i> RI	4 μ l	-	-	-	4 μ l	-	-	-
PCR amplification RLR 2 digérée <i>Nco</i> I - <i>Eco</i> RI	-	4 μ l	-	-	-	4 μ l	-	-
PCR amplification RLR 3 digérée <i>Nco</i> I - <i>Eco</i> RI	-	-	4 μ l	-	-	-	4 μ l	-
Vecteur pARAPONB digérée <i>Nco</i> I - <i>Eco</i> RI	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	-	-	-	-
Vecteur pET26b+ digérée <i>Nco</i> I - <i>Eco</i> RI	-	-	-	-	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Tampon de ligation	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Ligase	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	12 μ l	12 μ l	12 μ l	16 μ l	12 μ l	12 μ l	12 μ l	16 μ l

200 µl de cellules MC1061 chimiocompétentes (4) ont été transformées avec 10 µl de chaque ligation par un choc thermique (5), et les cellules ainsi transformées ont été étalées sur un milieu de sélection.

Aucun clone n'a été obtenu après transformation des témoins de ligation TL pAR et TL pET, indiquant ainsi que les vecteurs pARAPONB et pET26b+ linéarisés *Nco* I - *Eco* RI ne peuvent pas subir une ligation intramoléculaire.

2) Criblage par PCR.

Un premier criblage des clones obtenus après transformation des ligations avec le vecteur pARAPONB a été réalisée par PCR. 42 colonies, 14 de chaque ligation LpAR1, LpAR2 et LpAR3, ont été resuspendues individuellement dans un mélange de PCR contenant 5 µl de tampon de polymérisation, 40 pmol de chaque oligonucléotide A1 et A2, 5 µl de dNTPs 2mM et 5U de Taq ADN polymérase dans un volume final de 50 µl. Un témoin négatif a été constitué en ajoutant au mélange de PCR 50 ng du plasmide pBR322 à la place d'une colonie. Ces 43 tubes ont été incubés dans un thermocycleur Perkin-Elmer 9600 selon le programme suivant : (94°C 5 min.) - (94°C 30 sec. - 46°C 30 sec. - 72°C 1 min.) x 29 cycles - (72°C 2 min.). 5 µl de chacune de ces réactions PCR ont ensuite été incubés 1 heure à 37°C dans un mélange contenant 2 µl de tampon de restriction A, 2 µl de BSA (à 1 mg/ml) et 5 U de l'enzyme de restriction *Pvu* II dans un volume final de 20 µl.

10 µl de chacune de ces digestions ont été déposées sur un gel d'agarose TBE 1% en parallèle de 5 µl de chaque PCR non digérée (ce qui permet de ne pas confondre d'éventuelles bandes non spécifiques de la PCR avec un fragment obtenu par digestion de restriction). Après migration et coloration au bromure d'éthidium de ce gel, les bandes issues de la digestion par l'enzyme *Pvu* II ont été analysées afin de déterminer quel(s)

fragment(s) des mutants initiaux s'étaient associé(s) avec les autres pour reconstituer un gène entier. Ce criblage révèle la présence de 27 gènes portant une mutation, 7 gènes portant deux mutations et de 8 gènes ne portant plus de mutation.

3) Criblage par minipréparation d'ADN plasmidique.

Le deuxième criblage a été effectué en réalisant une extraction de l'ADN plasmidique (5) de 21 clones issus de la transformation des ligations avec le vecteur pET26b+ (7 clones de chaque ligation). 5 µl de l'ADN plasmidique ainsi obtenu pour chaque clone a été incubé 1 heure à 37°C en présence d'un mélange contenant 1 µl de tampon de restriction C, 6 U de l'enzyme *Pst* I, 3 U de l'enzyme *Nco* I et 6 U de l'enzyme *Eco* RI dans un volume final de 10 µl. 5 µl de chacune de ces digestions ont été déposées sur un gel d'agarose TBE 1%. Après migration et coloration au bromure d'éthidium de ce gel, les bandes issues de la digestion par l'enzyme *Pst* I ont été analysées afin de déterminer quel(s) fragment(s) des mutants initiaux s'étaient associé(s) avec les autres pour reconstituer un gène entier. Ce criblage révèle la présence de 13 gènes portant une mutation, 5 gènes portant deux mutations et de 3 gènes ne portant plus de mutation.

4) Analyse statistique des recombinaisons.

En fonction de la position de chaque mutation par rapport aux sites de coupure des enzymes *Hinf* I et *Bsa* I, comme représenté à la figure 6, il est possible de calculer la probabilité d'obtenir au cours de la réaction de RLR la création d'un gène portant 0, 1, 2, 3 ou 4 des mutations des gènes initiaux.

Ainsi, en considérant que la réaction de RLR est totalement aléatoire les probabilités P sont les suivantes :

$$P(0 \text{ mutation}) = \prod_{i=6}^9 \left(\frac{i}{10} \right) = 30,24\%$$

$$P(1 \text{ mutation}) = \sum_{n=1}^4 \left[\frac{n}{10-n} \prod_{i=1}^4 \left(\frac{10-i}{10} \right) \right] = 44,04\%$$

$$P(2 \text{ mutations}) = \sum_{n=1}^4 \left[\sum_{a=1}^{4-n} \left(\frac{10-a}{a} \right) \left(\frac{10-(a+n)}{a+n} \right) \prod_{i=1}^4 \left(\frac{i}{10} \right) \right] = 21,44\%$$

$$P(3 \text{ mutations}) = \sum_{n=1}^4 \left[\left(\frac{10-n}{n} \right) \prod_{i=1}^4 \left(\frac{i}{10} \right) \right] = 4,04\%$$

$$P(4 \text{ mutations}) = \prod_{i=1}^4 \left(\frac{i}{10} \right) = 0,24\%$$

Les deux criblages effectués donnent des résultats proches de ces prévisions statistiques, comme rapporté dans le tableau VI ci-dessous, indiquant ainsi que la réaction de RLR est quasi aléatoire. Une proportion légèrement plus élevée de gènes portant une mutation, au détriment des gènes portant zéro mutation est observée. Ce phénomène pourrait être attribué à une faible toxicité du gène *ponB* déjà observée et à la légère fuite des vecteurs d'expression pARAPONB et pET26b+, qui favoriseraient la sélection de gènes portant une mutation inactivante.

Tableau VI

%	0 mutation	1 mutation	2 mutations	3 mutations	4 mutations
Statistique	30,24	44,04	21,44	4,04	0,24
Criblage PCR	21	63	16	0	0
Criblage mini-préparation	14	62	24	0	0

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1) Broome-Smith J.K., Edelman A., Yousif S. et Spratt B.G., (1985), The nucleotide sequence of the *ponA* and *ponB* genes encoding penicillin-binding proteins 1A and 1B of *Escherichia coli* K12, Eur. J. Biochem., **147**, 437-446.

2) Cadwell R.C. et Joyce G., 1992, Randomization of genes by PCR mutagenesis, PCR Methods and Application, **2**, 28-33.

3) Cagnon C., Valaverde V. et Masson J.-M., (1991), A new family of sugar inducible expression vectors for *Escherichia coli*, Prot. Eng., **4**, 843-847.

4) Hanahan D., (1985), Techniques for transformation of *Escherichia coli*, dans DNA cloning : a practical approach, Glover D.M. (Ed), IRL Press, Oxford **vol I**, 109-135.

5) Maniatis T., Fritsch E.F. et Sambrook J., (1982), Molecular cloning. A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

6) Landt et al., Gene, **96**, 125-128, 1990

7) Lefèvre F., Analyse topologique de la Penicillin Binding Protein 1b d'*Escherichia coli*, 1997, Thèse.

8) Lefèvre F., Rémy M.H. et Masson J.M., 1997 (a), Alanine-stretch scanning mutagenesis : a simple and efficient method to probe protein structure and function, Nuc. Acids Res., **25**, 447-448.

- 9) Lefèvre F., Rémy M.H. et Masson J.M., 1997 (b), Topographical and functional investigation of *Escherichia coli* Penicillin-Binding Protein 1b by alanine stretch scanning mutagenesis, J. Bacteriol., **179**, 4761-4767.
- 10(Picard et al., Nuc. Acids Res., 22, 2587-2591, 1994.
- 11) Stemmer W.P.C., (1994), Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling, Nature, **370**, 141-144.
- 12) Studier F.W. et Moffatt B.A., 1986, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol., **189**, 113-130.
- 13) Zhao H., Giver L., Shao Z., Affholter J.A. et Arnold F., 1998, Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination, Nature Biotech., **16**, 258-261.

REVENDEICATIONS

1) Procédé de production *in vitro* de
séquences polynucléotidiques recombinées à partir d'une
5 banque de séquences polynucléotidiques, caractérisé en
ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la fragmentation d'une banque initiale de
séquences polynucléotidiques double-brins,

b) la dénaturation des fragments issus de
10 l'étape (a) éventuellement en présence d'une ou
plusieurs matrice(s) d'assemblage,

c) l'hybridation desdits fragments en
présence d'une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage si
celle(s)-ci n'est (ne sont) pas présente(nt) à l'étape
15 (b),

d) la ligation desdits fragments,

e) le clonage des séquences
polynucléotidiques recombinées.

2) Procédé selon la revendication 1,
caractérisé en ce qu'il comprend la répétition des
étapes (b), (c) et (d) à la fin de l'étape (d).

3) Procédé selon l'une des revendications 1
25 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend la séparation des
séquences polynucléotidiques recombinées de la ou des
matrice(s) d'assemblage avant l'étape (e).

4) Procédé selon l'une des revendications 1
30 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend l'amplification
des séquences polynucléotidiques recombinées double brin
avant l'étape (e) de clonage.

5) Procédé selon l'une quelconque des
35 revendications 1 à 4 caractérisé en ce que les
extrémités des fragments générés à l'étape (a) sont
telles qu'il puisse y avoir hybridation adjacente de ces

extrémités sur la ou les matrice(s) d'assemblage à l'étape (c) et ligation de ces fragments les uns avec les autres à l'étape (d).

- 5 6) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les séquences polynucléotidiques de la banque initiale présentent des zones d'homologie soit entre elles, soit avec les matrices d'assemblage, permettant de générer des extrémités de fragments qui permettent l'hybridation adjacente de ces extrémités sur la ou les matrice(s) d'assemblage à l'étape (c) et ligation de ces fragments les uns avec les autres à l'étape (d).
- 10
- 15 7) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les étapes (c) et (d) sont réalisées simultanément.
- 20 8) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on contrôle le degré de recombinaison et la position des points de recombinaison par la fragmentation de l'étape (a).
- 25 9) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la banque initiale de l'étape (a) est générée à partir d'un gène sauvage par étapes de mutagenèse dirigée successive, par mutagenèse aléatoire, ou en combinant des gènes de familles proches ou distinctes au sein de la même espèce ou d'espèces différentes de façon à disposer d'une variété de séquences polynucléotidiques dans la banque initiale.
- 30
- 35 10) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape (a) consiste à soumettre la banque initiale à

une hydrolyse par l'action d'une ou plusieurs enzymes de restriction.

5 11) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape (a) consiste à soumettre la banque initiale à une hydrolyse par action d'enzymes de restriction ayant un grand nombre de sites de coupure sur les séquences polynucléotidiques de la banque initiale ou en combinant
10 plusieurs enzymes de restriction.

 12) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que à l'étape (a), on prépare des fragments dont la taille est
15 supérieure ou égale à 40 pb.

 13) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape (a) consiste à générer une banque de fragments par traitement aléatoire avec la Dnase I de la banque
20 initiale de séquences polynucléotidiques double brin.

 14) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape (b) est réalisée en combinant au moins deux
25 banques de fragments distinctes générées séparément à l'étape (a) à partir de la même banque initiale par un traitement avec des enzymes différentes.

 15) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les fragments générés à l'étape (a) sont générés par PCR à partir de séquence(s) polynucléotidique(s) de la banque
30 initiale.

 16) Procédé selon l'une des revendications
35 13 à 15, caractérisé en ce que les fragments obtenus à

l'étape (a) servent de matrice d'assemblage les uns pour les autres à l'étape (b) ou à l'étape (c).

5 17) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que la matrice d'assemblage des étapes (b) ou (c) du procédé est une séquence polynucléotidique issue de la banque initiale ou une séquence consensus de ladite banque simple ou double brin.

10

18) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que les matrices d'assemblage des étapes (b) ou (c) du procédé sont constituées d'oligonucléotides.

15

19) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que l'étape (c) est réalisée en présence d'oligonucléotides simple ou double brin de longueur variable.

20

20) Procédé de production *in vitro* de séquences polynucléotidiques recombinées présentant des propriétés avantageuses par rapport à des séquences témoins, caractérisé en ce que l'on réalise un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, puis en ce que l'on crible par tout moyen approprié les clones obtenus pour sélectionner ceux comprenant des séquences polynucéotidiques présentant des propriétés avantageuses par rapport à des séquences témoins.

25
30

21) Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le criblage des clones est réalisé *in vitro*.

35

22) Une séquence polynucléotidique recombinée obtenue par le procédé de l'invention selon l'une quelconque des revendications 1 à 21.

23) Un vecteur contenant une séquence polynucléotidique recombinée selon la revendication 22.

5 24) Un hôte cellulaire transformé par une séquence polynucléotidique recombinée selon la revendication 22 ou par un vecteur selon la revendication 23.

10 25) Une protéine codée par une séquence polynucléotidique recombinée selon la revendication 22.

15 26) Une banque constituée de séquences polynucléotidiques recombinées selon la revendication 22, ou de vecteurs selon la revendication 23, ou d'hôtes cellulaires transformés selon la revendication 24, ou de protéines selon la revendication 25.

PROCÉDÉ DE PRODUCTION *IN VITRO* DE SÉQUENCES
POLYNUCLÉOTIDIQUES RECOMBINÉS, BANQUES DE SÉQUENCES ET
SÉQUENCES AINSI OBTENUES.

5 La présente invention se rapporte à une
méthode de production *in vitro* de séquences
polynucléotidiques recombinaées comprenant les étapes
suivantes : (a) la fragmentation d'une banque initiale
de séquences polynucléotidiques double-brins, (b) la
10 dénaturation des fragments issus de l'étape (a)
éventuellement en présence d'une ou plusieurs matrice(s)
d'assemblage, (c) l'hybridation desdits fragments en
présence d'une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage si
celle(s)-ci n'est (ne sont) pas présente(nt) à l'étape
15 (b), (d) la ligation desdits fragments, (e) le clonage
des séquences polynucléotidiques recombinaées.

Figure 1 A

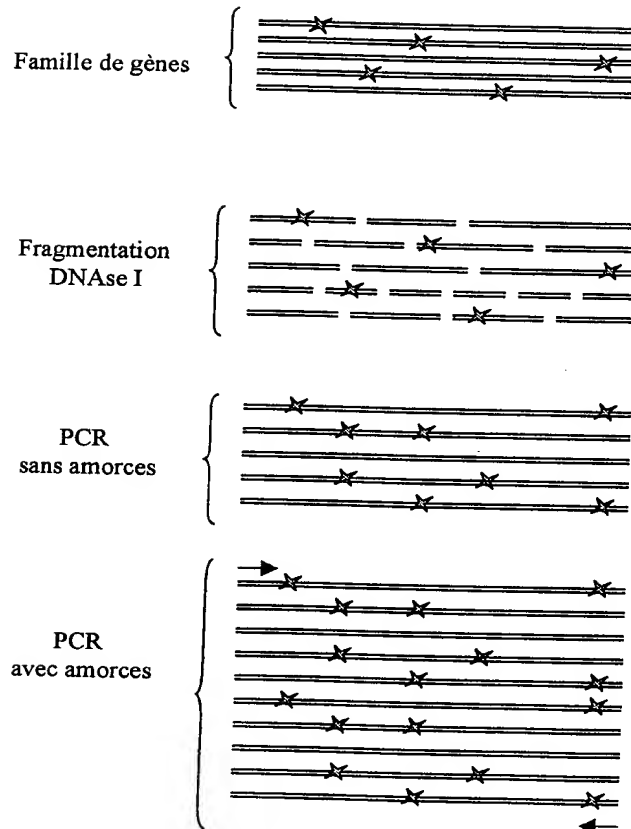


Figure 1 B

(Procédé réalisé en double brin, mais illustré ici sur un seul brin)

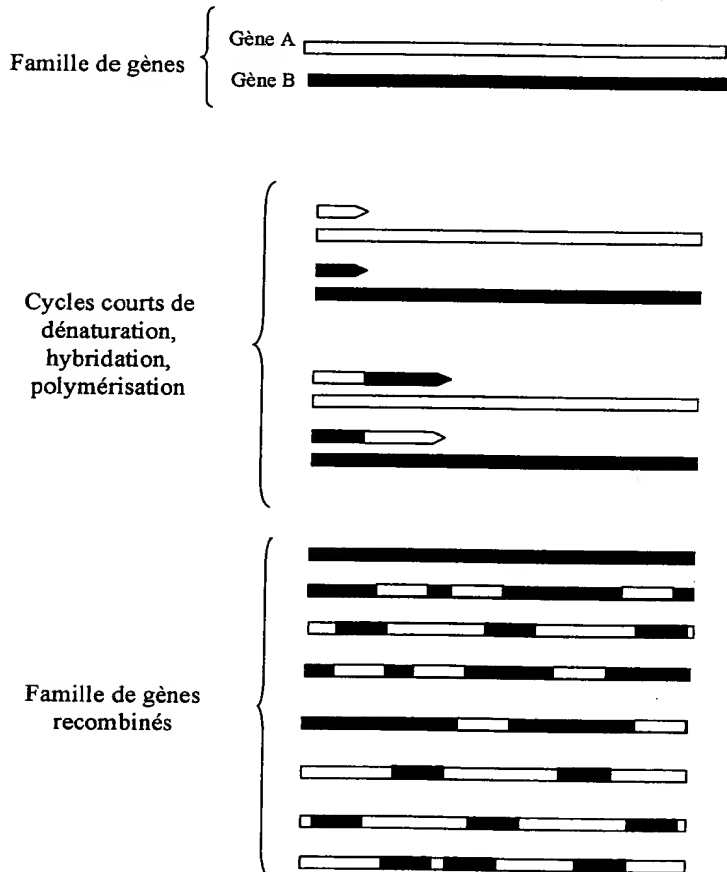


Fig.2

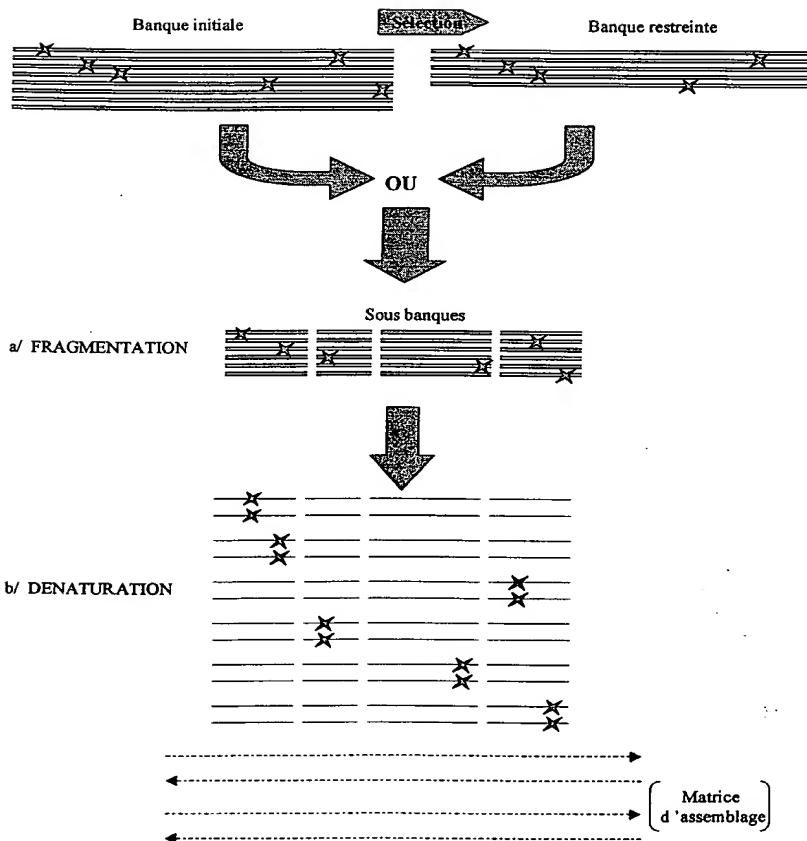


Fig.2 Suite 1

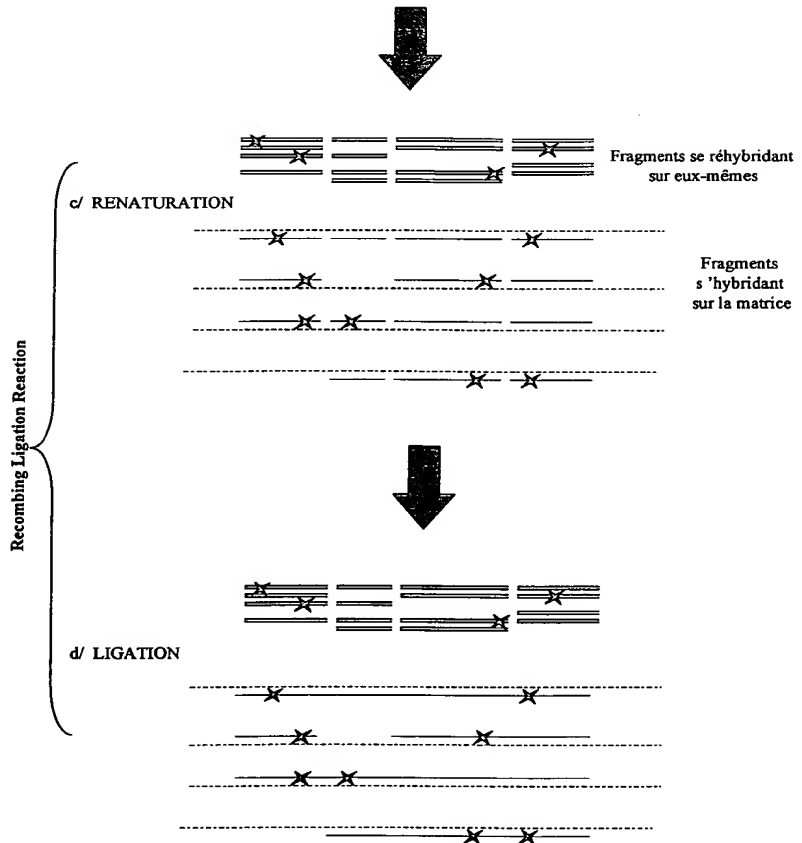
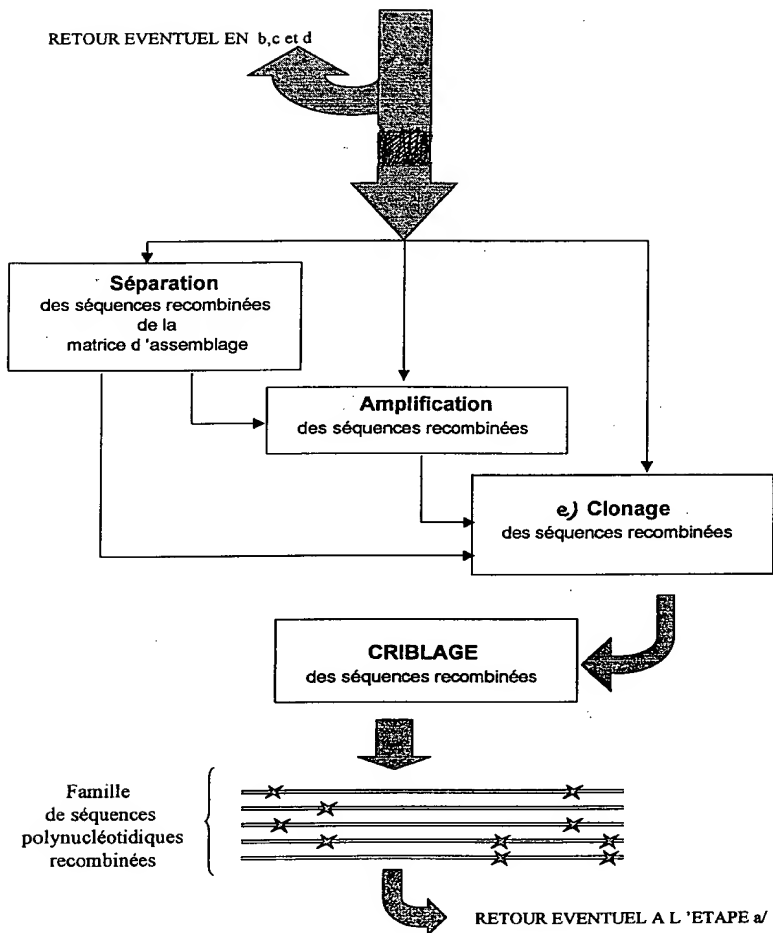


Fig.2 Suite2



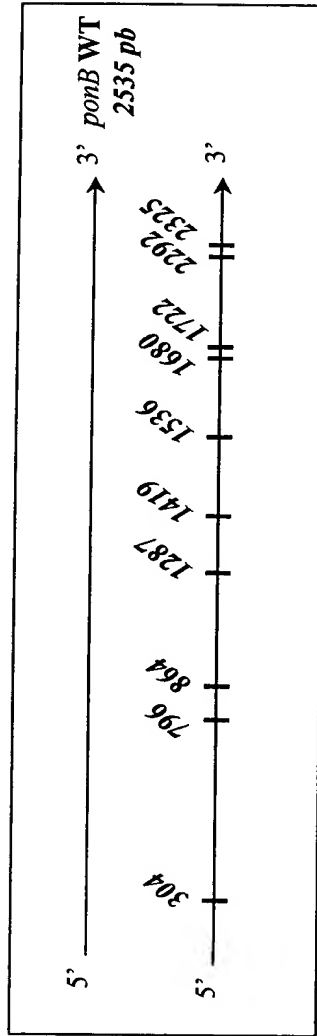


Figure 3: Position des dix zones de mutations (sites *Pvu* II et *Pst* I)

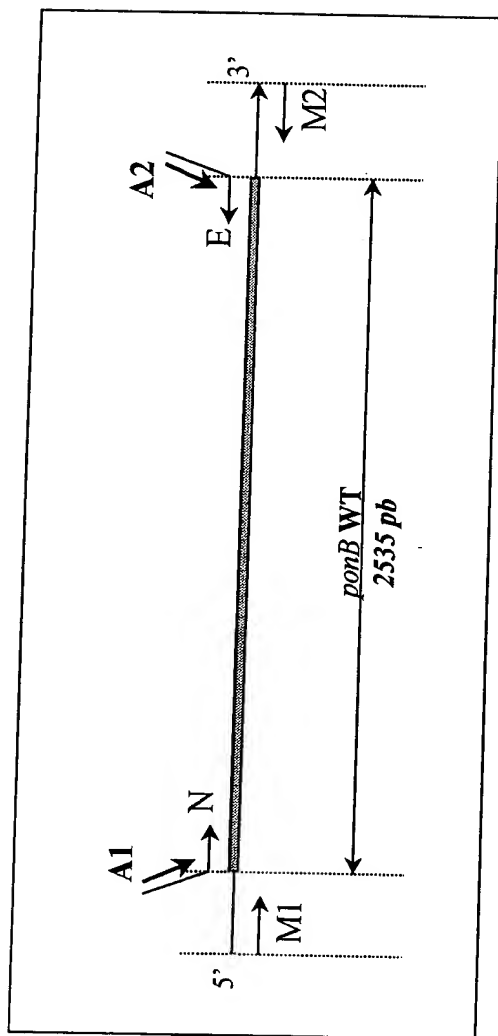


Figure 4 : Position des amorces utilisées par rapport à la séquence du gène *ponB*

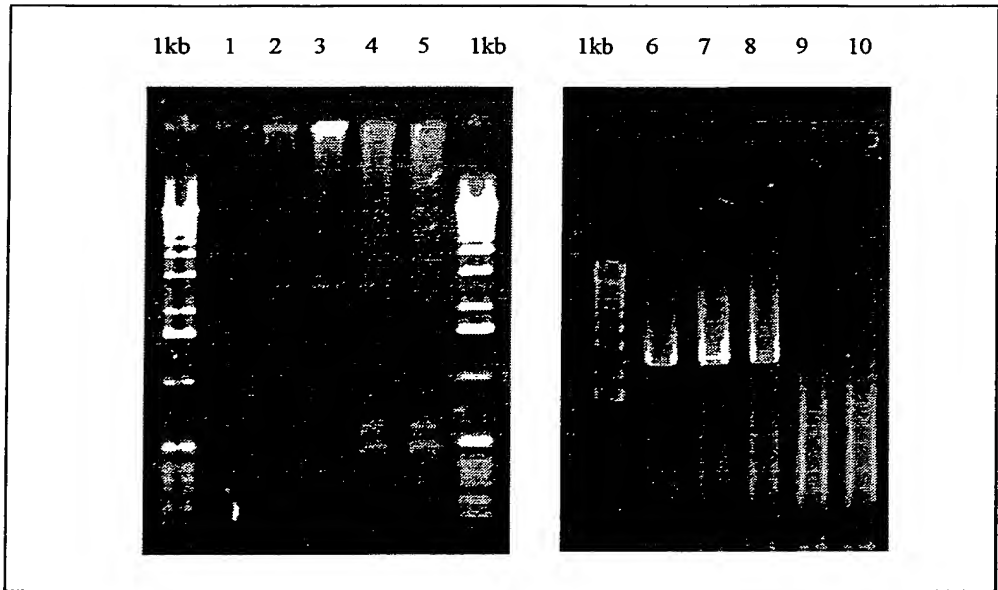


Figure 5 : Migration des réactions de RLR et des amplifications PCR de ces réactions

<i>Pistes :</i>	<i>1/ RLR 1</i>	<i>6/ PCR RLR 1</i>
	<i>2/ RLR 2</i>	<i>7/ PCR RLR 2</i>
	<i>3/ RLR 3</i>	<i>8/ PCR RLR 3</i>
	<i>4/ RLR 4</i>	<i>9/ PCR RLR 4</i>
	<i>5/ Témoin RLR</i>	<i>10/ PCR Témoin RLR</i>

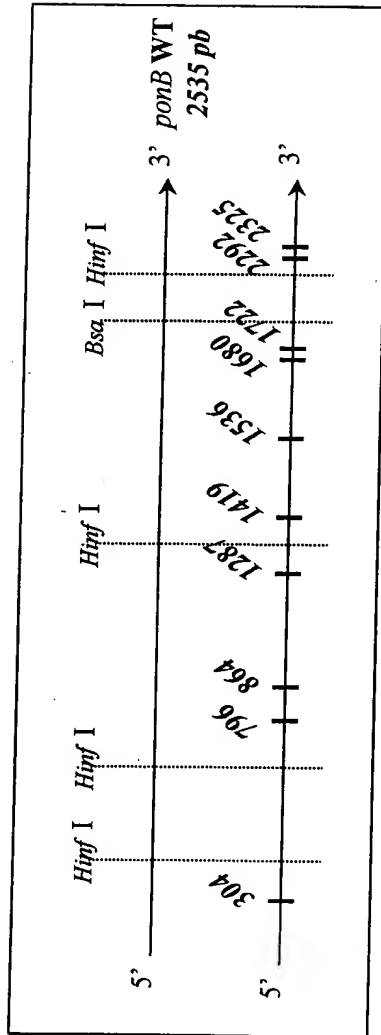


Figure 6 : Position des mutations par rapport aux fragments de restriction

